

#3

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Chieko OHSUMI et al

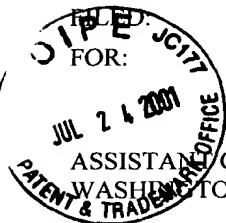
SERIAL NO: 09/810,186

March 19, 2001

FOR: A METHOD FOR INCREASING STRESS-RESISTANCE TO A PLANT

REQUEST FOR PRIORITY

ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS
WASHINGTON, D.C. 20231



SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Provisional Application Serial Number, filed, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e).
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
JAPAN	072668/2001	MARCH 14, 2001

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ is submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number .
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
(B) Application Serial No.(s)
 - ☐ are submitted herewith
 - ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.

FD Vastine

Norman F. Oblon

Registration No. 24,618



22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 10/98)

Frederick D. Vastine
Registration No. 27,013

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日
Date of Application:

2001年 3月14日

出 願 番 号
Application Number:

特願2001-072668

出 願 人
Applicant(s):

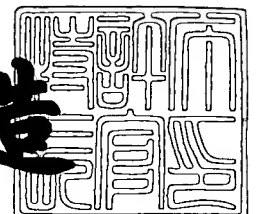
味の素株式会社
理化学研究所



2001年 5月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3044041

【書類名】 特許願

【整理番号】 P01-0027

【提出日】 平成13年 3月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/05

【発明の名称】 植物に対するストレス耐性付与方法

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社
中央研究所内

 【氏名】 大住 千栄子

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地1 理化学研究所
筑波研究所内

 【氏名】 太治 輝昭

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台3丁目1番地1 理化学研究所
筑波研究所内

 【氏名】 篠崎 一雄

【特許出願人】

 【識別番号】 000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

【特許出願人】

 【識別番号】 000006792

 【氏名又は名称】 理化学研究所

【代理人】

 【識別番号】 100091096

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 植物に対するストレス耐性付与方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ラフィノース合成酵素遺伝子を植物体内に導入することを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 2】 上記ラフィノース合成酵素遺伝子は、以下の(a)又は(b)の遺伝子であることを特徴とする請求項 1 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

(a)配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

(b)配列番号 1 のアミノ酸配列における少なくとも 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 3】 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする請求項 1 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 4】 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする請求項 1 記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 5】 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 6】 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【請求項 7】 以下の(c)又は(d)のタンパク質を、植物内に過剰発現させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(c)配列番号 1 のアミノ酸配列を含むタンパク質。

(d)配列番号 1 のアミノ酸配列における少なくとも 1 又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、植物に対して優れた乾燥耐性及び/又は高塩濃度耐性等のストレス耐性を付与することができる植物に対するストレス耐性付与方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

地球上の陸地の約3分の1は乾燥地に属し、今後予想される深刻な食糧不足への対策として乾燥地域の農業利用の重要性が認識されるようになってきた。また、現在の技術では過剰な灌漑水による塩類集積や乾燥や高熱により、農耕に不適な乾燥、半乾燥土壌の全体に占める割合が年々増大しており、この問題解決は急務である（石谷 学 他 植物の化学調節Vol.25, No.2, 149-162, 1990）。この問題に対する解決法としては、これらの環境ストレスに対する耐性機構を解明し、耐性を持つ植物を作出するという方法が挙げられる。

【0003】

植物は移動の自由を持たないため、自身が置かれた環境の変化を耐え抜いて成長分化を続けていかなければならない。このため植物は環境の変化に速やかに応答して適応する応答機構を、進化の過程で獲得してきたものと考えられる。植物を取り巻く環境因子のうち乾燥や塩類集積は、陸上植物にとって生死に関わる重要な因子であり、また、植物の生長に大きな影響を与える因子となる。植物は乾燥ストレスを受けると成長が阻害され、細胞は膨圧が低下し種々の生理的過程に影響を受ける（Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, Plant Physiol. 115:327-334, 1997）。

【0004】

植物においては、これらのストレスに対して個体レベル、組織レベル及び細胞レベルで種々の応答機構が働き、さらに分子生物学的研究により遺伝子発現レベルでも応答していることが明らかにされた。すなわち、種々の植物で乾燥や塩処理により、mRNA量が増加するストレス誘導性の遺伝子が数多く存在するといった遺伝子発現レベルでの応答機構が明らかとなった。植物は、これらのストレス誘導性遺伝子群の産物のいずれかにより耐性を獲得するものと考えられている。

【0005】

これらストレス誘導性遺伝子群の発現には、植物ホルモンの一種であるアブシ

ジン酸 (Abscissic acid; ABA) が深く関与しており、植物が乾燥などのストレスを受けるとABA依存的経路とABA非依存的経路によりシグナル伝達され、このシグナル伝達によりストレス誘導性遺伝子群の発現を調節していることが知られている。この遺伝子群には、プロリンやグリシンベタインといった適合溶質の合成に関わるものなどが含まれている。プロリンやグリシンベタインは非常に良く研究が進んでおり、これらの合成系又は分解系を操作して過剰にプロリンやグリシンベタインを蓄積させたトランスジェニック植物で、NaClや低温のストレスに対して耐性を示すことが知られている。

【0006】

ところで、RFOの生合成経路は、図4に示すように、初めにガラクトキノール合成酵素によってガラクトキノールが合成され、このガラクトキノールとシュクロースを基質としてラフィノース合成酵素によりラフィノースが合成され、さらにガラクトキノールとラフィノースとを基質としてスタキオース合成酵素によりスタキオースが合成される。このラフィノース、スタキオースの総称をRFOという。これまでのRFOに関する報告としては、ラフィノース及びスタキオースが種子の乾燥耐性に重要な役割を果たしていることを示唆するもののみであった(Blackman S. A. et al. Plant Physiol. 100:225-230,1992, Ooms J.J.J. et al. Plant Physiol. 102:1185-1192,1993)。

しかしながら、種子ではなく植物体におけるRFOの機能や役割等に関する報告はなかった。種子と植物体とでは、重複する乾燥耐性獲得機構を持つ場合もあれば、全く別の機構が働いていることもある。

【0007】

例えば、植物においては、乾燥などのストレスにさらされると先に述べたABAを蓄積させることによって、気孔を閉鎖し、水分蒸散を抑制することによって過剰な水分の体外流出を防ぐことが知られている。実際にABAの合成系に変異が生じたシロイヌナズナのABA欠損変異株である*aba1*は通常湿度下では生育できないほど萎れやすくなっている。しかしながら、ABA欠損変異株の種子においては、完全に乾燥しても発芽することが出来る。つまりABA欠損変異株の種子における乾燥耐性の低下は認められない(Koornneef, M et al., Physiol. Plant. 61:377

-383, 1984, Duckham, S.C. et al., Plant Cell and Environ. 14:601-606, 1991, Rock, C.D. and Zeevaart, J.A.D., Proc.Natl. Acad. Sci. 88:7496-7499, 1991)。

【0008】

また、シロイヌナズナのABA非感受性変異株であるabi3は、種子の乾燥耐性が失われており、完全に乾燥させると発芽能を失うことが知られているが、乾燥が進む前に播種させた種子では発芽でき、しかも植物体ではaba1のような萎れる表現型は観察されない(Nambara, E., et al, Plant J. 2:435-441, 1992, Kriz, A.R., et al, Plant Physiol. 92:538-542, 1990, Parcy, F., et al, Plant Cell 6:1567-1582)。つまり種子の乾燥耐性獲得については種子のみで機能するABI3がABAよりも遙かに大きい働きを持つことが考えられる。

【0009】

このように、種子と植物体とでは、乾燥耐性獲得機構に大きな隔たりがあり、種子の乾燥耐性に重要と示唆されているRFOがそのまま植物体の乾燥耐性にもなんらかの役割を果たしているのかは不明であり、予測すらできないのが現状であった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明は、上述したような実状に鑑み、乾燥及び/又は高塩濃度等の環境ストレスに対して耐性を持つ植物体を作出することを可能とする植物に対するストレス耐性付与方法を提供することを目的とする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

上述した目的を達成するため本発明者が鋭意検討した結果、植物体内のラフィノース量を増大させることによって、当該植物体にストレス耐性を付与することができるといった知見を得て、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は以下を包含する。

(1) ラフィノース合成酵素遺伝子を植物体内に導入することを特徴とする植

物に対するストレス耐性付与方法。

【0013】

(2) 上記ラフィノース合成酵素遺伝子は、以下の(a)又は(b)の遺伝子であることを特徴とする(1)記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

(a)配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする遺伝子。

(b)配列番号1のアミノ酸配列における少なくとも1又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【0014】

(3) 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする(1)記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

【0015】

(4) 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする(1)記載の植物に対するストレス耐性付与方法。

【0016】

(5) 植物体内におけるラフィノース量を増大させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【0017】

(6) 植物体内におけるラフィノース合成活性を向上させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

【0018】

(7) 以下の(c)又は(d)のタンパク質を、植物内に過剰発現させることを特徴とする植物に対するストレス耐性付与方法。

(c)配列番号1のアミノ酸配列を含むタンパク質。

(d)配列番号1のアミノ酸配列における少なくとも1又は数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質。

【0019】

【発明の実施の形態】

以下、本発明に係る植物に対するストレス耐性付与方法を詳細に説明する。

本発明に係る植物に対するストレス耐性付与方法は、植物体内に例えば、ラフィノース合成酵素をコードする遺伝子（ラフィノース合成酵素遺伝子と呼ぶ）を導入することによって、当該植物体にストレス耐性を付与する手法である。ここで、対象となる植物としては、特に限定されないが、例えば、シロイヌナズナ、ダイズ、ソラマメ、ナタネ、ヒマワリ、ワタ、シュガービート、イネ、サトウキビ、コーン及びソルガム等を挙げることができる。

【0020】

ここで、ラフィノース合成酵素遺伝子とは、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードするのであるかぎりいかなるものでも良い。ラフィノース合成酵素活性とは、シュクロースとガラクトノールを基質としてラフィノースを合成する活性をいう。具体的には、シュクロース及びガラクトノールを有する反応液に、植物体から抽出したラフィノース合成酵素を含む画分を加えてラフィノース合成反応を行い、反応溶液中に生じたラフィノースを定量することによってラフィノース合成活性を評価することができる。なお、所定時間経過後、例えば、反応液の4倍量のエタノールを加え、95℃で30秒加熱することによってラフィノース合成反応を停止させることができる。

【0021】

また、ラフィノース合成酵素遺伝子は、植物体から調製することができる。植物体としては、ラフィノースを合成している植物であればいかなる植物体でもよく、例えば、シロイヌナズナ、ソラマメ、ナタネ、ヒマワリ、ワタ、シュガービート等を挙げることができる。

【0022】

ラフィノース合成酵素遺伝子は、GenBankなどのデータベースを用いて、ダイズ由来のラフィノース合成酵素遺伝子（配列番号2）に対し相同性を有する遺伝子を検索することによって、塩基配列情報を得ることができる。ホモロジー解析プログラムはLipman-Pearson法を採用したGENETIX-MAC（遺伝子情報処理ソフトウェア、ソフトウェア開発社）などを用いてもよく、また、インターネット上に公開されているものを使用してもよい。このよ

うな方法により得られた塩基配列は遺伝子全長を含む場合と、遺伝子全長を含まない場合がある。遺伝子全長を含まない場合は、目的植物組織より抽出したRNAを鋳型に、ダイズ由来のラフィノース合成酵素遺伝子と相同性の高い部位に対応するプライマーを用い、5' RACE法、3' RACE法にて、容易に全長遺伝子を取得することができる。得られた全長遺伝子は、Soluble Protein Expression System(INVITROGEN社)や、Tight Control Expression System (INVITROGEN社)や、QIAexpress System(QIAGEN社)などのキットが提供する適当な発現ベクターに組み込み、遺伝子を発現させ、記載の方法でラフィノース合成酵素活性を測定し、活性を有するクローンを選抜すればよい。遺伝子の発現方法については、Plant Molecular Biology, A Laboratory Manual (Melody S. Clark (Ed.), Springer)などに詳しく記載されている。

【0023】

ラフィノース合成酵素遺伝子は、単離したpoly(A)+RNAからcDNAライブラリーを調製し、このcDNAライブラリーをハイブリダイゼーションによってスクリーニングすることによって、取得することができる。ハイブリダイゼーションに用いるプローブは、ラフィノース合成酵素の部分アミノ酸配列に基づいて合成されたオリゴヌクレオチドをプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction、以下PCRと称する)によって増幅することによって、取得することができる。

【0024】

以下に、poly(A)+RNAからラフィノース合成酵素遺伝子を取得する方法を具体的に説明する。poly(A)+RNAの抽出部位としては、ラフィノース合成酵素遺伝子が発現していれば如何なる部位を用いても良い。

全RNAを抽出するには、効率よく損傷の少ないRNAが得られるならば方法は制限されず、例えば、フェノール/SDS法、グアニジンイソチオシアネート/塩化セシウム法等、公知のいずれの方法によっても可能である。こうして得た全RNAからオリゴ(dT)担体を用いてpoly(A)+RNAを分離できる。また、全RNAを抽出せずにpoly(A)+RNAを得ることのできるキット(MPG Direct mRNA Purification Kit, CPG, INC.社等)を使用しても良い。

【0025】

cDNAライブラリーを作製するためには、まずpoly(A)+RNAを鋳型にし、オリゴ(dT)プライマー、ランダムプライマー等を用い、逆転写酵素によって一本鎖cDNAを合成し、次にグブラー・ホフマン(Gubler and Hoffman)法、オカヤマ・バーグ(Okayama-Berg)法(Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor press, 1989)等により二本鎖cDNAを合成する。ラフィノース合成酵素遺伝子の発現量が少ない場合には、PCRを利用したcDNAライブラリー作製キット(Capfinder PCR cDNA Library Construction Kit(CLONTECH社)等)を用いて、PCRによってcDNAを増幅してもよい。このようにして合成したcDNAは、平滑末端化、リンカーの付加、PCRによる制限酵素サイトの付加等を行うことにより、ファージベクター、プラスミド等のクローニングベクターにクローニングできる。

【0026】

cDNAライブラリーのスクリーニングに使用するプローブのDNA断片は、PCRを行うことで得ることができる。例えば、ダイズ、キュウリなどの植物における既知のラフィノース合成酵素遺伝子の塩基配列情報を用いて、両者で相同性が高く保存されている領域を求め、その領域をPCRで増幅してプローブとすることができる。また、抽出対象植物のゲノム配列を蓄積したデータベースから該遺伝子のホモログを検索し、抽出対象植物におけるラフィノース合成酵素遺伝子ホモログを同定し、PCRにおけるプライマーを設計することができる。

【0027】

このように設計して合成したプライマー及びcDNAを用いてPCRを行うことによって、ハイブリダイゼーションに使用するプローブを作製することができる。また、いわゆるRACE法(Rapid Amplification of cDNA End:PCR PROTOCOLS A Guide to Methods and Applications, ACADEMIC press INC. p28~38)を行ってプローブを作製しても良い。プローブのラベルには、ラジオアイソトープ、ビオチン等、種々のものを用いることができるが、ランダムプライミング法でラベルすることが望ましい。また、スクリーニングにはハイブリダイゼーションではなくPCRを用いてもよい。さらに、ハイブリダイゼーションとPCRを組み

合わせてもよい。

【0028】

ラフィノース合成酵素遺伝子のクローニングには、上述した方法以外に下記の方法が挙げられる。

(1) 植物体からラフィノース合成酵素を単離精製し、決定されるアミノ酸配列を基に全塩基配列を化学合成する。

(2) 植物体から染色体DNAを調製し、プラスミドベクター等を用いて染色体DNAライブラリーを作製し、このライブラリーからラフィノース合成酵素遺伝子を、ハイブリダイゼーション又はPCRによって取得する。尚、染色体由来のラフィノース合成酵素遺伝子は、コード領域にイントロンが含まれることが予想されるが、このようなイントロンによって分断されたDNAであっても、ラフィノース合成酵素をコードする限り本発明のDNAに含まれる。

(3) poly(A)+RNAを分子量等によって分画し、ホイトジャーム又はウサギ網状赤血球を用いたインビトロ翻訳系に供し、ラフィノース合成酵素活性を有するポリペプチドをコードするmRNAが存在する画分を決定し、それより目的のcDNA断片を作製、取得する。

(4) ラフィノース合成酵素抗体を作製し、タンパク質発現ベクターにcDNAライブラリーを乗せ、適当な宿主に感染させてcDNAがコードするタンパク質を発現させ、この抗体を用いて目的のcDNAをスクリーニングする。

(5) ペプチド断片のアミノ酸配列から適当なプライマーを合成し、RACE法によって、末端を含む配列を増幅し、これをクローニングする。

【0029】

ラフィノース合成酵素遺伝子を発現させるには、酵素をコードする領域のDNAを種々の発現ベクターに組み込めばよく、詳しくは、Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual(M.S.Clark(eds.),Springer)などに記載されている。ベクターとしては、市販の発現ベクターを使用してもよい。発現の確認は、本明細書に記載の方法によって活性を測定することによって行うことができる。

【0030】

ラフィノース合成酵素遺伝子としては、配列番号1のアミノ酸配列を含むタン

パク質をコードするもの、又は、配列番号1のアミノ酸配列における少なくとも1以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を含み、ラフィノース合成活性を有するタンパク質をコードするものが挙げられる。また、ラフィノース合成酵素遺伝子としては、配列番号2のものが挙げられる。

【0031】

ラフィノース合成酵素遺伝子は、ラフィノース合成酵素の活性、すなわちガラクトチノールとシュクロースとからラフィノースを生成する活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むラフィノース合成酵素タンパク質をコードするものであってもよい。ラフィノース合成活性とは、シュクロースとガラクトチノールを基質としてラフィノースを合成する活性をいう。具体的には、シュクロース及びガラクトチノールを有する反応液に、植物体から抽出したラフィノース合成酵素を含む画分を加えてラフィノース合成反応を行い、反応溶液中に生じたラフィノースを定量することによってラフィノース合成活性を評価することができる。なお、所定時間経過後、例えば、反応液の4倍量のエタノールを加え、95℃で30秒加熱することによってラフィノース合成反応を停止させることができる。ラフィノース合成活性を有するとは、配列番号1または2に示されるラフィノース合成酵素が有する活性の30%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上の活性を保持するものをいう。

【0032】

アミノ酸配列が改変されたラフィノース合成酵素遺伝子を調製するための当業者によく知られた方法としては、例えば、PCRによるin vitro変異導入法が挙げられる（伊沢毅、PCRによるin vitro mutagenesis、151-158頁、監修 島本功、佐々木卓治、細胞工学別冊植物細胞工学シリーズ7新版植物のPCR実験プロトコール、秀潤社）。タンパク質におけるアミノ酸の改変は、人為的に行うのであれば、通常、200アミノ酸以内、好ましくは100アミノ酸以内、さらに好ましくは50アミノ酸以内、さらに好ましくは10アミノ酸以内である。また、塩基配列の変異によりコードする蛋白質のアミノ酸配列が変異することは、自然界においても生じ得る。このように天然型のラフィノース合成酵素において、1もしくは複数

のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を有するタンパク質をコードする遺伝子であっても、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードする限り、ラフィノース合成酵素遺伝子に含まれる。また、たとえ、塩基配列が変異した場合でも、それが蛋白質中のアミノ酸の変異を伴わない場合（縮重変異）もあり、このような縮重変異体もラフィノース合成酵素遺伝子に含まれる。

【0033】

配列番号1以外のアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするラフィノース合成酵素遺伝子は、例えば、配列番号2に示したラフィノース合成酵素遺伝子に対して部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配列を改変することによっても得られる。また、上記のような改変されたラフィノース合成酵素遺伝子は、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、ラフィノース合成酵素遺伝子をヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びラフィノース合成酵素遺伝子を保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、植物体の個体差、品種間差、遺伝子の多コピー化、各器官、組織の違いに基づく場合などの天然に生じる変異も含まれる。

【0034】

上記のような変異を有するラフィノース合成酵素遺伝子を、適当な細胞で発現させ、発現産物のラフィノース合成酵素活性を調べることにより、配列番号1以外のアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素をコードするラフィノース合成酵素遺伝子を得られる。また、変異を有するラフィノース合成酵素遺伝子とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ラフィノース合成酵素活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、配列番号1以外のアミノ酸配列を有するラフィノース合成酵素をコードするラフィノース合成酵素遺伝子を得られる。ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる

特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎラフィノース合成酵素活性を記述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。ラフィノース合成活性を有するとは、配列番号1または2に示されるラフィノース合成酵素が有する活性の30%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上のを保持するものをいう。

【0035】

植物体内に上述したようなラフィノース合成酵素遺伝子を導入することによって、ラフィノース合成酵素を過剰発現するトランスジェニック植物を得ることができる。ラフィノース合成酵素遺伝子を導入する際には、所定のプロモーターの下流に当該ラフィノース合成酵素遺伝子を連結した発現ベクターを構築する。発現ベクターを構築する際には、詳しくは、Plant Molecular Biology-A Laboratory Manual(M.S.Clark(eds.),Springer)などに記載されている方法を適宜使用する。ベクターとしては、市販のものを使用してもよい。また、形質転換の方法としては、特に限定されないが、アグロバクテリウム感染方法(特公平2-58917号公報参照)、エレクトロポレーション方法(特開平5-68575号公報参照)、パーティクルガン法(特開平5-508316号公報参照)等を挙げることができる。特に、アブラナ科植物に対する形質転換は、Plan Cell Reports(1987), 6, 321-325に記載の方法に準じて行うことができる。ダイズに対する形質転換は、Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 145(1989)、TIBTECH, 8, 145(1990)、Bio/Technology, 6, 923(1988)、Plant Physiol., 87, 671(1988)

, Plant Physiol., 91, 1212 (1992)、 Bio/Technology, 6, 915 (1988)、 Plant Physiol., 99, 81 (1992)等に記載の方法に準じて行うことができる。イネに対する形質転換は、「モデル植物の実験プロトコール イネ、シロイヌナズナ編」78頁記載の方法に準じて行うことができる。さらに、ラフィノース合成酵素遺伝子の発現の確認は、本明細書に記載の方法によって活性を測定することによって行うことができる。

【0036】

得られたトランスジェニック植物においては、ストレスに対する耐性が向上している。ここで、ストレスとは、例えば、高塩濃度条件及び/又は乾燥条件を意味する。得られたトランスジェニック植物は蒸散量を抑えることによって、土壤中に水分吸収を抑制することができる。ここで、乾燥条件とは、野生型植物が生育できる環境において湿度、給水が制限された状態で野生型植物の生育が抑制されるような条件を意味する。また、ここで高塩濃度条件とは、特に制限はないが、農業肥料、または、酸性土壌、アルカリ性土壌における塩（例えば、NaCl）を高濃度で含む条件を意味する。

【0037】

高塩濃度条件及び/又は乾燥条件といったストレスに対する耐性が向上するというのは、野生型植物の生育が抑制される又は生育できないような条件下であっても、生育が抑制される程度が抑えられることを意味する。ここで、生育を評価する方法としては、特に限定されず、例えば、生育速度、草丈、重量、葉面積、花の稔性、花粉稔性、種子重量若しくは収量又はこれらの組み合わせ等を挙げることができる。

【0038】

なお、トランスジェニック植物としては、ホモ接合体、野生型植物とホモ接合体を戻し交雑したヘテロ後代植物であってもよい。また、野生型植物と比較してヘテロ接合体、ヘテロ接合体と比較してホモ接合体の方がストレスに対する耐性がより向上していることがある。

【0039】

植物体内にラフィノース合成酵素遺伝子を導入することによって、植物体内の

ラフィノース量を増大させることができる。ラフィノースは、シュクロースのグルコシル基にガラクトースが $\alpha-1, 6$ 結合したラフィノース族オリゴ糖の一つである。ラフィノースは、ガラクチノールとシュクロースとを基質としてラフィノース合成酵素により合成される。植物体内におけるラフィノース量を測定する際には、先ず、ラフィノースを含む抽出液を植物体から抽出する。抽出液は、植物体を液体窒素により凍結後、破碎し、これにあらかじめ80℃に暖めておいた10 mlの80%エタノールを加えた後、90℃で10分間煮出し、この煮出しをさらに二回、合計三回行うことによって得ることができる。

【 0 0 4 0 】

次に、この抽出液をHPLC（高速液体クロマトグラフィー）に供し、ラフィノースを定量する。HPLCに際して、例えば、糖分析システムDX500（CarboPac PA1カラム、パルスドアンペロメトリー検出器（ダイオネクス社製））を用いることができる。このように、植物体からの抽出液に含まれるラフィノース量を定量することによって、当該植物内におけるラフィノース量の増加を検出することができる。

【 0 0 4 1 】

本方法において、ラフィノース量を増大させるとは、同条件で生育した野生型の植物体内におけるラフィノース量と比較して多量のラフィノースを含有することを意味する。具体的に、ロゼット葉において、新鮮重あたりのラフィノース含量が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1から50倍、好ましくは2倍から30倍、より好ましくは5から20倍の程度となることを意味する。更に好ましくは、植物体全体において、新鮮重あたりのラフィノース含量が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1から50倍、好ましくは2倍から30倍、より好ましくは5から20倍の程度となることを意味する。

【 0 0 4 2 】

ここで、植物内におけるラフィノース合成活性を向上させることによって、植物体内のラフィノース量を増大させることができ、その結果、植物に対してストレス耐性を付与することができる。ラフィノース合成活性とは、シュクロースとガラクチノールを基質としてラフィノースを合成する活性をいう。具体的には

、シュークロース及びガラクトノールを有する反応液に、植物体から抽出したラフィノース合成酵素を含む画分を加えてラフィノース合成反応を行い、反応溶液中に生じたラフィノースを定量することによってラフィノース合成活性を評価することができる。なお、所定時間経過後、例えば、反応液の4倍量のエタノールを加え、95℃で30秒加熱することによってラフィノース合成反応を停止させることができる。

【0043】

また、植物内におけるラフィノース合成活性を向上させるとは、同条件下で生育した野性型植物体内のラフィノース合成酵素活性と比較し、新鮮重あたりの活性若しくは比活性又は葉あたりの活性若しくは比活性を向上させることを意味する。具体的には、ロゼット葉において、新鮮重あたりの活性が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1から50倍、好ましくは2倍から30倍、より好ましくは5から20倍の程度となることを意味する。更に好ましくは、植物体全体において新鮮重あたりの活性が、無処理の野性型植物のレベルに対し、1.1から50倍、好ましくは2倍から30倍、より好ましくは5から20倍の程度となることを意味する。ただし、野性株における内在性のラフィノース合成酵素活性は、植物種や生育環境によっては検出できない場合がある。その場合、植物内におけるラフィノース合成活性を向上させるとは、検出できる程度の活性を有することを意味する。

【0044】

植物内のラフィノース合成活性を増加させる方法としては、ラフィノース合成酵素遺伝子を発現可能なベクターに組み込みこれを植物に導入する方法、ラフィノース合成酵素遺伝子を植物の染色体上に導入する方法、ラフィノース合成酵素の上流の酵素であるガラクトノール合成酵素をコードする遺伝子とともにラフィノース合成酵素遺伝子を発現可能なベクターに組み込みこれを植物に導入する方法、ラフィノース合成酵素の上流の酵素であるガラクトノール合成酵素をコードする遺伝子とともにラフィノース合成酵素遺伝子を植物の染色体上に導入する方法、染色体上のラフィノース合成酵素遺伝子の発現を増強するような転写因子をコードする遺伝子を植物体に導入する方法などがあげられる。

【0045】

また、ラフィノース合成酵素遺伝子の発現が向上した変異株をスクリーニングしても良く、具体的には、エチルメタンスルフォネート（EMS）等の化学変異剤を用いてラフィノース合成活性を増加させる方法としては、エチルメタンスルフォネート（EMS）等の化学変異剤を用いて得た変異株より蛋白質を抽出し、ウエスタン解析、あるいは、エライザ（ELISA）などで、ラフィノース合成酵素のタンパク質量の多いものを選抜することでも可能である。

【0046】

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願を、特に、W098/49273号公報をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

【0047】

【実施例】

以下、実施例を用いて本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

1. 形質転換用ベクタープラスミドの構築

ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子は、国際公開番号W098/49273号公報に記載された遺伝子を用いた。形質転換のためのプラスミドは、図1に示すように、pBIN19由来のプラスミドpBI121（CLONTECH社製）を利用し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモータ（図1においては「35S-Pro」と記載）と、ノパリン合成酵素遺伝子ターミネター（図1においては「Nos-ter」と記載）間のGUS遺伝子をダイズ由来ラフィノース合成酵素cDNA（図1においては「Raffinose Synthase」と記載）と置換することにより構築した。

【0048】

具体的には、ダイズ由来ラフィノース合成酵素をコードする遺伝子を含む塩基配列番号（配列番号2）における156番目塩基の開始コドンの上流にXba1サイトを付加したプライマーと、1260番塩基のSac1サイトを含むプライマーを用いてPCRを行いXba1-Sac1断片を得た。また、1260番塩基のSac1サイトから、2448番目の終止コドンを含む領域は、2448番目のすぐ後にSac1サイトを付加して増幅させた。ベクターpBI121は、Xba1、Sac1消化し、GUS遺伝

子を除き、ダイズラフィノース合成酵素 cDNA を鋳型として増幅させた XbaI-SacI 断片及び SacI-SacI 断片とともにライゲーションした。ライゲーションミックスを *E. coli* HB101 に形質転換し、プラスミドの塩基配列解析を行い、ダイズラフィノース合成酵素 cDNA 配列を有するプラスミドを選抜し pBI121-s SRS とした。

【0049】

2. 形質転換

上記 1. で調製したベクタープラスミド (pBI121-s SRS) を、トリペアレンタルメイティング法を用いて *Agrobacterium tumefaciens* C58 に導入し、*Agrobacterium tumefaciens* C58/pBI121-s SRS を調製した。得られた *Agrobacterium tumefaciens* C58/pBI121-s SRS を、vacuum infiltration 法を用いてシロイヌナズナ *col-0* (LEHLE SEEDS 社製) に形質転換した。

【0050】

得られた種子は、滅菌処理後、カナマイシン $25 \mu\text{g/ml}$ を含む選抜培地に播種し形質転換体を選抜した。耐性を示した幼植物はハイポネクス 1000 倍液を含むロックウールに定植し、 22°C 、12 時間照射下で順化栽培した。なお、シロイヌナズナの形質転換法と薬剤耐性株の選抜方法は、「モデル植物の実験プロトコール イネ、シロイヌナズナ編 (監修 島本功、岡田清孝)」(秀潤社) 記載の方法を用いた。

【0051】

得られた形質転換体 5 系統 (SRS-1~4 と称する) について、下記のプライマー 1 及びプライマー 2 及びゲノム DNA を用いた PCR により遺伝子の導入を確認した。

プライマー 1 : $5' \text{---TTT CCG GTT CAA GTT ATG GT---} 3'$ (配列番号 3)

プライマー 2 : $5' \text{---CAA TGC ATC CGT TAT CAG TA---} 3'$ (配列番号 4)

鋳型となるゲノム DNA は、薬剤耐性を指標に選抜した形質転換体候補株の T2 世代の葉より Plant DNeasy DNA 抽出キット (QUIAGEN 社製) を用いて精製した。PCR は、 97°C 1 分の熱変性工程後、 95°C 15 秒、 56°C 15 秒及び 72°C 60 秒を 1 サイクルとして 30 サイクルとするプログラムとした。PCR 後、増幅された DNA 断片をアガロースゲル電気泳動で確認した。

【 0 0 5 2 】

3. 形質転換植物における導入遺伝子の発現解析

形質転換植物SRS-1～5における、ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の発現を、ノーザンハイブリダイゼーション、ウエスタンブロット解析により確認するとともに、形質転換植物におけるラフィノース合成活性を検討した。

【 0 0 5 3 】

＜ノーザンハイブリダイゼーション解析＞

まず、T3世代植物体の葉より全量RNAを抽出精製した。RNAの抽出には、Rneasy Plant Mini Kit(キアゲン社製)を用いた。抽出したRNAは、各々20 μ gを変性ゲルにて電気泳動し、HybondN⁺に転写した。プローブとしては、pBI121-s SRSを鋳型として上記プライマー1及びプライマー2を用いたPCRを行い、増幅したDNA断片を用いた。増幅したDNA断片にはAlphosDirect(アマシャムファルマシアバイオテック社製)を用いてラベルした。HybondN⁺に対するプローブのハイブリダイゼーションは、60℃で、一晩行い、60℃に加温した緩衝液でキットプロトコールに従って洗浄した。CDP-Star(ファルマシアバイオテック社製)を用いて、ハイブリダイズしたプローブを検出した結果を図2に示す。なお、図2において、レーン1は野生型、レーン2はSRS-1、レーン3はSRS-2、レーン4はSRS-3、レーン5はSRS-4を示している。

【 0 0 5 4 】

＜ウエスタンブロット解析＞

まず、ダイズ由来ラフィノース合成酵素抗体を調製するため、大腸菌内でダイズ由来ラフィノース合成酵素を発現させた。

【 0 0 5 5 】

大腸菌内でダイズ由来ラフィノース合成酵素を発現させるための発現用プラスミドは以下のように構築した。すなわち、まず、ダイズ由来ラフィノース合成酵素cDNAをpET16bベクターのNde1、BamHIサイトへクローニングした。次に、配列番号2に示した塩基配列における開始コドン156～158番目のATGにNde1サイトを付加するとともに579～581番目のXhoIサイトを含む断片をPCRにて増幅し、SRS cDNAのXhoI-BamHI断片とともに、pET16b (NOVAGEN社製)のNde1、BamHIサイ

トヘクローニングした。次に、終止コドンの後ろにBamHIサイトを付加したBamHI-BamHI断片をPCRにて増幅し、SRSNdeI-BamHI断片をつないたpET16bのBamHIサイトヘクローニングした。構築したプラスミドは塩基配列解析を行い、正しいダイズ由来ラフィノース合成酵素塩基配列を有するクローンを選抜した。得られたプラスミドはpET16bSRSとした。このプラスミドpET16bSRSをE.coli BL21(DE3) pLysS(Stratagene社製)に形質転換し、形質転換した大腸菌を-80℃にて保存した。

【 0 0 5 6 】

E.coli BL21(DE3) pLys/pET16bSRSは、50 μ g/mlカルベニシリンを含むLB培地で一晩前培養し、これを0.1mlとり50mlの培地に植菌し、約3時間培養後、最終濃度1mM IPTGを添加し、さらに3時間培養した。この培養液を8000rpm、20分間の遠心分離して菌体を集め、これをB-PERキット(ピアス社製)にて処理し、可溶性画分、不溶性画分を得た。SDS-PAGEにてダイズ由来ラフィノース合成酵素の発現を確認したところ、ダイズ由来ラフィノース合成酵素は不溶性画分に存在していた。

【 0 0 5 7 】

不溶性画分を、8M尿素で溶解し、His-Ttrap (ファルマシアバイオテック社製)カラムにて、ダイズ由来ラフィノース合成酵素-HisTag融合タンパク質を精製した。これをウサギに免疫することにより、ダイズ由来ラフィノース合成酵素抗体を得た。

【 0 0 5 8 】

このように得られたダイズ由来ラフィノース合成酵素抗体を用いて以下のよう
にウエスタンブロット解析を行った。すなわち、先ず、解析対象の植物体を液体窒素下で、乳鉢にて磨砕し、抽出ブッファ- (50mM Tris-HCl, 5mMDTT, 1mM PMSF, 0.1% PolyclarAT, pH7.0)にて抽出した。抽出液は、ミラクロス (Calbiochem社製)にて濾過し、ろ液を冷却遠心し、遠心上清をPD-10カラム (ファルマシアバイオテック社製)にかけ、低分子を除き、セントリプレップ10 (amicon社製)にて濃縮し粗抽出液とした。この粗抽出液をSDS-PAGEに供した。

【 0 0 5 9 】

SDS-PAGEには、マルチゲル 7.5%（第一化薬社製）を用いた。電気泳動後、P VDF membrane（BIORAD社製）にエレクトロブロッティングした。ウエスタンブロット解析は、アンプリファイドAPイミューンブロットキット（BIORAD社製）を用いた。シロイヌナズナCol-0ではシロイヌナズナ由来のラフィノース合成酵素のバンドが、ダイズ未熟種子ではダイズ由来ラフィノース合成酵素のバンドが検出され、形質転換体（SRS-1～4）では、両方のバンドが検出された。

【0060】

＜形質転換植物におけるラフィノース合成活性の検討＞

上記ウエスタンブロット解析の際に得られた粗抽出液を用いて、形質転換植物におけるラフィノース合成活性を検討した。ラフィノース合成活性は、粗抽出液を以下の組成の酵素反応液に加え、ラフィノースを定量した。最終濃度が下記の組成になるように調製した反応液に10～50 μ lの粗抽出液を添加して全量を100 μ lとし、32℃で60～120分間、ラフィノース合成反応を行った。

【0061】

反応液組成

- 2.5 mM シュクロース（ナカライテスク社製）
- 5.0 mM ガラクチノール（和光純薬社製）
- 5.0 mM DTT（ナカライテスク社製）
- 20.0 mM トリス塩酸緩衝液（pH7.0）（ナカライテスク社製）

所定時間経過後、反応液の4倍量のエタノールを加え、95℃で30秒加熱しラフィノース合成反応を停止させた。次に、反応液を遠心し、遠心上清を減圧乾固した後に蒸留水に溶解し、糖分析システムにて反応液中のラフィノースを定量した。糖分析システムとしては、ダイオネクス社 DX500、カラムとしてはCarboPac P A1(4×250)（ダイオネクス社製）、検出器としてはPAD（ダイオネクス社製）を用いた。結果を表1に示す。

【0062】

【表 1】

	ラフィノース nmol/hr/mg タンパク質
Col-o	—
s-SRS-1	14.0
s-SRS-2	4.7
s-SRS-3	6.7
s-SRS-4	7.2

—:検出されず

【0063】

4. 形質転換植物の乾燥耐性

上記3. でダイズ由来ラフィノース合成酵素を発現するシロイヌナズナにおける乾燥耐性を評価した。

上記3. で得られた形質転換植物の種子及び野生型の種子を滅菌し、下記の組成を有するGM寒天培地プレートに播種し、22℃、12時間照明下で培養した。

【0064】

GM寒天培地組成(pH5.7(KOH))

1 L Murashige-Skoog塩培地 (シグマ社製)

1ml×1000 B5ビタミン溶液 (シグマ社製)

0.5g MES (ナカライテスク社製)

30g スクロース (ナカライテスク社製)

8g 培地用寒天BA30 (伊那食品工業社製)

GM寒天培地プレートは、上記組成を混合し、オートクレーブにより滅菌後、直径9 cmのシャーレに分注して作製した。

【0065】

GM寒天培地プレート上で発芽した後、3週間の植物体を1000倍ハイポネクスで湿らせたメトロミクス350を入れた鉢 (直径8cm、高さ6cmのビニルポット (T0-8)) に定植した。植物体の定植数は1鉢あたり7個体とした。この鉢をバットに入れ、乾燥を防ぐため、3日間サランラップ (旭化成社製) で覆い、その後、当該サランラップを除いた。バットには1cmの高さで1000倍ハイポネクスを加え、水位

の低下に応じ水を足した。

【 0 0 6 6 】

移植の1週間後、鉢をキムタオルの上に30分置き、鉢の水分をできるだけ除去した。その後、鉢は乾燥したバットに入れ、乾燥処理を行った。乾燥処理から3週間後の植物体の様子を図3に示した。図3から判るように、形質転換体では、野生型と比較して優れた乾燥耐性を示すことが明らかとなった。このことから、植物体内にラフィノースを多量に発現させることによって、植物体に優れた乾燥耐性を付与することができることが明らかとなった。

【 0 0 6 7 】

【発明の効果】

以上詳細に説明したように、本発明によれば、植物体内にラフィノースを多量に発現させることによって、当該植物体に対してストレス耐性を付与することができる。したがって、本発明によれば、各種環境ストレスに対して耐性を持つ植物体を作出することが可能となる。

【 0 0 6 8 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> AJINOMOTO CO., INK

RIKEN

<120> A method for providing a property of stress-resistance

<130> P01-0027

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 750

<212> PRT

<213> Glycine max

<400> 1

Met Thr Val Thr Pro Lys Ile Ser Val Asn Asp Gly Lys Leu Val Val

1 5 10 15

His Gly Lys Thr Ile Leu Thr Gly Val Pro Asp Asn Val Val Leu Thr

20 25 30

Pro Gly Ser Gly Arg Gly Leu Val Thr Gly Ala Phe Val Gly Ala Thr

35 40 45

Ala Ser His Ser Lys Ser Leu His Val Phe Pro Met Gly Val Leu Glu

50 55 60

Gly Leu Arg Phe Met Cys Cys Phe Arg Phe Lys Leu Trp Trp Met Thr

65 70 75 80

Gln Arg Met Gly Thr Cys Gly Arg Asp Val Pro Leu Glu Thr Gln Phe

85 90 95

Met Leu Ile Glu Ser Lys Glu Ser Glu Thr Asp Gly Glu Asn Ser Pro

100 105 110

Ile Ile Tyr Thr Val Leu Leu Pro Leu Leu Glu Gly Gln Phe Arg Ala
115 120 125

Val Leu Gln Gly Asn Asp Lys Asn Glu Ile Glu Ile Cys Leu Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Asn Ala Val Glu Thr Asp Gln Gly Leu His Met Val Tyr Met
145 150 155 160

His Ala Gly Thr Asn Pro Phe Glu Val Ile Asn Gln Ala Val Lys Ala
165 170 175

Val Glu Lys His Met Gln Thr Phe Leu His Arg Glu Lys Lys Arg Leu
180 185 190

Pro Ser Cys Leu Asp Trp Phe Gly Trp Cys Thr Trp Asp Ala Phe Tyr
195 200 205

Thr Asp Val Thr Ala Glu Gly Val Glu Glu Gly Leu Lys Ser Leu Ser
210 215 220

Gln Gly Gly Thr Pro Pro Arg Phe Leu Ile Ile Asp Asp Gly Trp Gln
225 230 235 240

Gln Ile Glu Asn Lys Ala Lys Asp Ala Thr Glu Cys Leu Val Gln Glu
245 250 255

Gly Ala Gln Phe Ala Thr Arg Leu Thr Gly Ile Lys Glu Asn Thr Lys
260 265 270

Phe Gln Lys Lys Leu Gln Asn Asn Glu Gln Met Ser Gly Leu Lys His
275 280 285

Leu Val His Gly Ala Lys Gln His His Asn Val Lys Asn Val Tyr Val
290 295 300

Trp His Ala Leu Ala Gly Tyr Trp Gly Gly Val Lys Pro Ala Ala Thr
305 310 315 320

Gly Met Glu His Tyr Asp Thr Ala Leu Ala Tyr Pro Val Gln Ser Pro
325 330 335

Gly Val Leu Gly Asn Gln Pro Asp Ile Val Met Asp Ser Leu Ala Val
340 345 350

His Gly Leu Gly Leu Val His Pro Lys Lys Val Phe Asn Phe Tyr Asn
355 360 365

Glu Leu His Ala Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Val Asp Gly Val Lys Val
370 375 380

Asp Val Gln Asn Ile Ile Glu Thr Leu Gly Ala Gly His Gly Gly Arg
385 390 395 400

Val Ser Leu Thr Arg Ser Tyr His His Ala Leu Glu Ala Ser Ile Ala
405 410 415

Ser Asn Phe Thr Asp Asn Gly Cys Ile Ala Cys Met Cys His Asn Thr

420

425

430

Asp Gly Leu Tyr Ser Ala Lys Gln Thr Ala Ile Val Arg Ala Ser Asp

435

440

445

Asp Phe Tyr Pro Arg Asp Pro Ala Ser His Thr Ile His Ile Ser Ser

450

455

460

Val Ala Tyr Asn Ser Leu Phe Leu Gly Glu Phe Met Gln Pro Asp Trp

465

470

475

480

Asp Met Phe His Ser Leu His Pro Ala Ala Asp Tyr His Ala Ala Ala

485

490

495

Arg Ala Ile Gly Gly Cys Pro Ile Tyr Val Ser Asp Lys Pro Gly Asn

500

505

510

His Asn Phe Asp Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Pro Asp Gly Ser Val

515

520

525

Leu Arg Ala Gln Leu Pro Gly Arg Pro Thr Arg Asp Ser Leu Phe Val

530

535

540

Asp Pro Ala Arg Asp Arg Thr Ser Leu Leu Lys Ile Trp Asn Leu Asn

545

550

555

560

Lys Cys Ser Gly Val Val Gly Val Phe Asn Cys Gln Gly Ala Gly Trp

565

570

575

Cys Lys Ile Glu Lys Lys Thr Arg Ile His Asp Thr Ser Pro Gly Thr

580

585

590

Leu Thr Ala Ser Val Cys Ala Ser Asp Val Asp Leu Ile Thr Gln Val

595

600

605

Ala Gly Ala Glu Trp Leu Gly Asp Thr Ile Val Tyr Ala Tyr Arg Ser

610

615

620

Gly Glu Val Ile Arg Leu Pro Lys Gly Val Ser Ile Pro Val Thr Leu

625

630

635

640

Lys Val Leu Glu Phe Glu Leu Phe His Phe Cys Pro Ile Gln Glu Ile

645

650

655

Ala Pro Ser Ile Ser Phe Ala Ala Ile Gly Leu Leu Asp Met Phe Asn

660

665

670

Thr Gly Gly Ala Val Glu Gln Val Glu Ile His Asn Arg Ala Ala Thr

675

680

685

Lys Thr Ile Ala Leu Ser Val Arg Gly Arg Gly Arg Phe Gly Val Tyr

690

695

700

Ser Ser Gln Arg Pro Leu Lys Cys Val Val Gly Gly Ala Glu Thr Asp

705

710

715

720

Phe Asn Tyr Asp Ser Glu Thr Gly Leu Thr Thr Phe Ser Ile Pro Val

725

730

735

Ser Pro Glu Glu Met Tyr Arg Trp Ser Ile Glu Ile Gln Val

740

745

750

<210> 2

<211> 2780

<212> DNA

<213> Glycine max

<400> 2

tcttcattg gaggaccatt tctcctgga atagaaatac taccacactt ttcttttttc 60
 acttctctaa gttgctaagt taattgctcc ttcatttttt cactcttcgt tctcgcgtac 120
 ccgtgtcacg gtaactcgtg gtgaagtgtt cgaaaatgac tgtcacacct aagatctcag 180
 ttaacgatgg gaaacttggt gtccatggta agaccattct gactggagtg ccagacaacg 240
 ttgtgctgac tccaggttct ggaaggggtc ttgtgactgg tgcttttgtt ggtgccacag 300
 cttcacacag caaaagtctc catgtgtttc caatgggtgt tttagagggg ctccggttca 360
 tgtgtttgtt ccggttcaag ttatggtgga tgactcagag aatgggaact tgtgggaggg 420
 atgttctctt ggagactcaa ttcattgctta ttgagagcaa agagagttaa actgatgggg 480
 agaattctcc aatcatctac actgtcttgc ttcctctcct cgaaggtaaa ttccgagctg 540
 ttcttcaagg caatgacaag aacgagatag agatttgcct cgagagtggg gataatgcag 600
 ttgagactga ccaaggcctt cacatgggtt acatgcatgc tgggaccaat ccctttgaag 660
 tcatcaatca agctgtcaag gctgtggaaa aacacatgca aacttttctt catcgtgaga 720
 agaaaaggtt gccatcttgt cttgactggt ttggatggtg cacatgggat gctttctata 780
 ctgatgtcac agctgagggt gttgaggaag gcctgaaaag tctatcacag ggagggtacac 840
 ctccacgatt cctcatcata gatgatggtt ggcaacagat tgaaaaataaa gcaaaggatg 900
 ctactgaatg tttggtacaa gaaggagcac agtttgctac taggttgact ggtattaaag 960
 agaatactaa atttcaaaaag aaattacaga acaatgagca gatgtcaggt ctgaagcatc 1020
 tagtacatgg agcaaagcag catcacaatg tgaaaaatgt atatgtatgg catgcactag 1080

ctggttattg ggggtggagtg aagccagcag caaccggcat ggaacattat gacactgcct 1140
 tggcataatcc agtgcagtca ccaggcgtgc taggaaacca accagacatt gtcattggaca 1200
 gcttggctgt acatggcctt ggcctagtgc acccaaagaa ggttttcaat ttctacaacg 1260
 agctccatgc ttacttagct tcttgtggag tagatggagt gaaggttgat gtgcagaaca 1320
 ttattgagac ccttgggtgcg ggacatgggtg gccgagtgtc acttactcgc agctatcatc 1380
 acgcgcttga ggcttccatt gctagcaatt ttactgataa cggtatgcatt gcgtgtatgt 1440
 gtcacaacac tgatggactt tatagtgtca agcagactgc tattgtgaga gcttctgatg 1500
 atttttaccc tegtgatect gcttcccata ccatccatat ttcttctgtt gcatacaact 1560
 cactattcct tggagaattc atgcaacctg actgggacat gtttcatagt ttacaccag 1620
 cagcagatta tcatgtgca gctcgtgcaa ttgggtggatg tcctatttat gttagtga 1680
 agccaggcaa tcacaatttt gatcttctta agaagctggg tctcccggat ggttcgggtc 1740
 tccgtgtcga gttacctggc aggccaactc gtgattctct atttgtggat ccagccagag 1800
 ataggactag cttgctcaaa atatggaacc tgaacaaatg ctctggagtt gttgggtgtat 1860
 ttaactgcca aggtgtctga tgggtgcaaga tagagaagaa aaccgcgcatc catgatacat 1920
 ctctgtgtac actcaccgcc tctgtctgcg cctctgatgt tgacctcatc acacaagtag 1980
 caggtgtcga atggcttggg gatacaattg tttatgttta cagatcaggt gaggtgattc 2040
 ggctaccaaa aggggtttca attccagtga cactaaaagt tctggagttt gagcttttcc 2100
 acttctgtcc aatccaagaa atagctccaa gtatatcatt tgcagcaata gggctactgg 2160
 atatgttcaa cactggagga gcagtggagc aggttgagat tcataaccga gcagcaacga 2220
 aaacaatagc tcttagtgta aggggaagag gcagatttgg agtttactcc tcccagagac 2280
 cactgaagtg tgtggttagt ggcgtgaaa ccgacttcaa ctatgactca gagaccgggt 2340
 tgacaacctt ctccattcca gtttctccag aggagatgta cagatgggtca atagagatcc 2400
 aagtttgagt cttttttaag acttgggtgtt tgatgcattg ttgtatcagg agaagggttt 2460
 tgttgtaatt aagcattgag ggaattgttg gagtcaggca gagagagagg ggggaggttt 2520
 gttgtaagac acctagtatt agtatcatgt agtggagaaa aagggttgtt gatcctaata 2580
 gctagacaag gcatgttgta gtagtcatgg ggtggggaag tccttttgtt gtagcatgta 2640
 atttggttta gacttgtagt atgtcatcaa ttagatggat aaagagagaa tattgttatc 2700
 taccgagga tgtaacaatg tttgtttctc tgaataaaaa gttcacatct gtcttttggg 2760
 ataataaaaa aaaaaaaaaa 2780

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 3

tttccggttc aagttatggt

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer

<400> 4

caatgcatcc gttatcagta

20

【 0 0 6 9 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 3, 4 は合成プライマーである。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子を有する形質転換用ベクタープラスミドの概略構成図である。

【図 2】

ダイズ由来ラフィノース合成酵素遺伝子の発現を解析するノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動写真である。

【図 3】

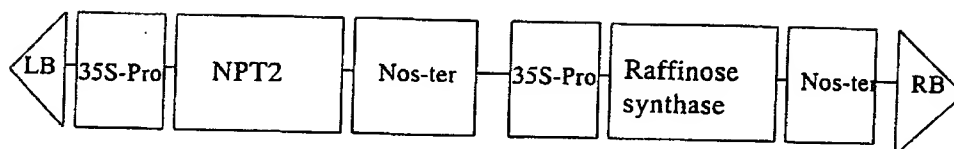
乾燥条件下における形質転換植物の生育状態を示す写真である。

【図 4】

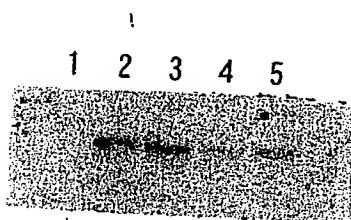
RFO合成経路を示す模式図である。

【書類名】 図面

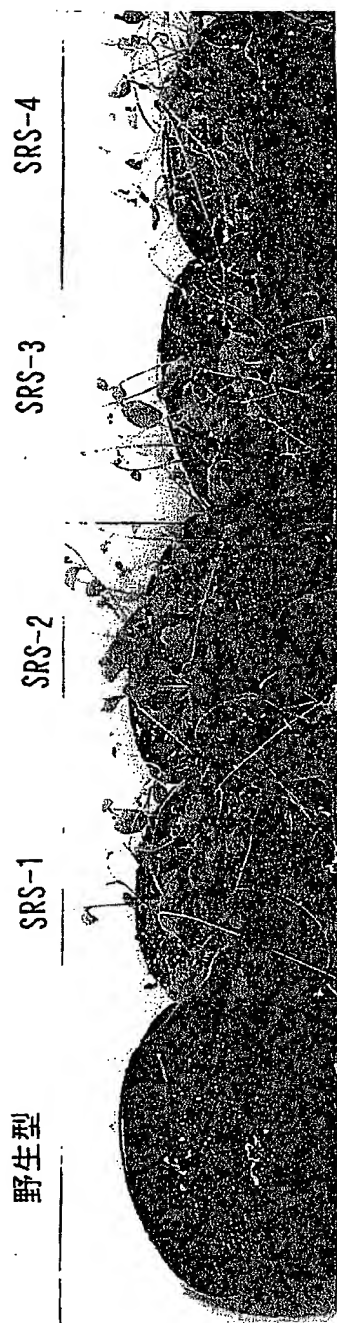
【図 1】



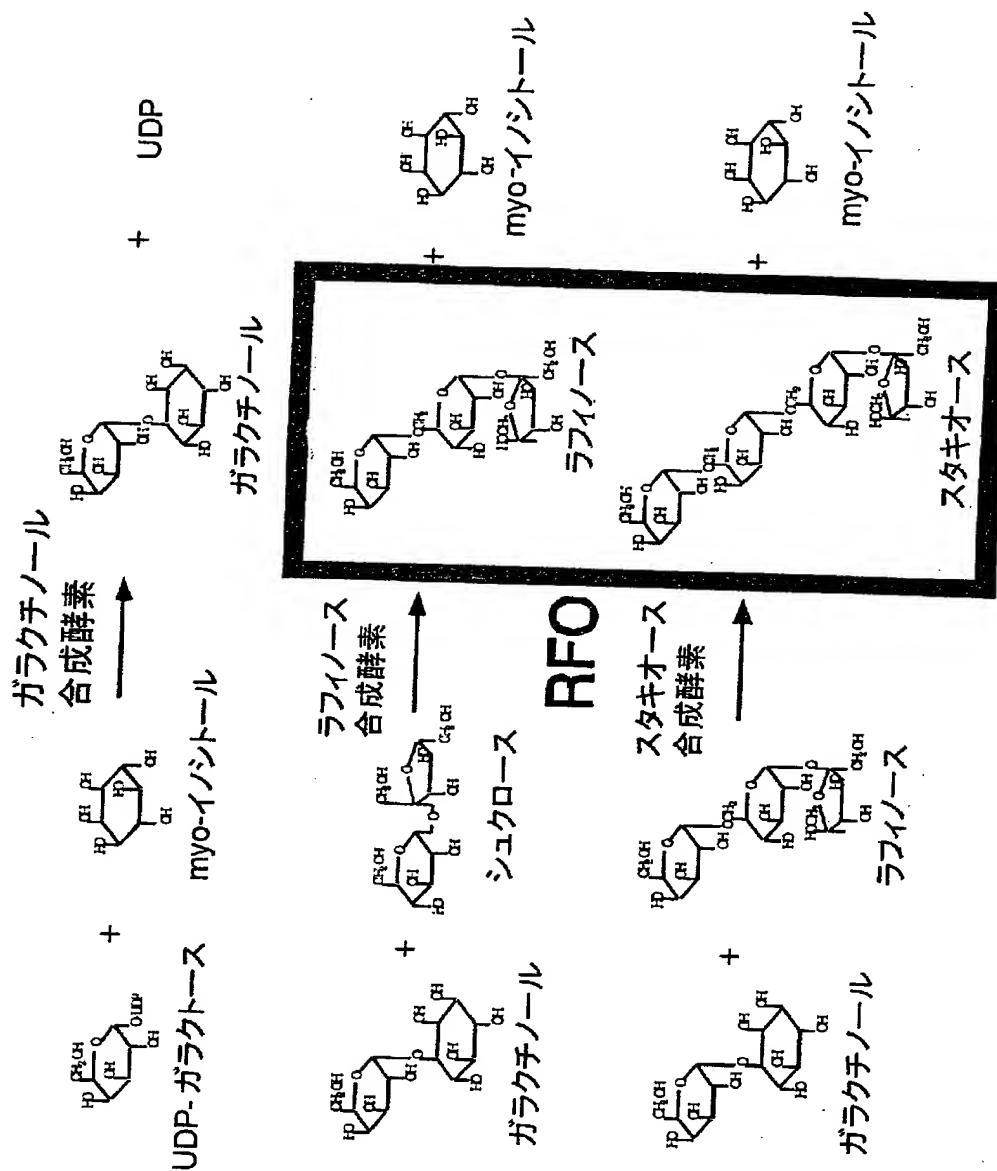
【図 2】



【図3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 乾燥等の環境ストレスに対して耐性を持つ植物体を作出することを可能とする。

【解決手段】 植物体内のラフィノース量を増大させることによって、当該植物体にストレス耐性を付与する。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0000000066]

1. 変更年月日

1991年 7月 2日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名

味の素株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名 理化学研究所